

2.6.32. ИСПЫТАНИЕ НА БАКТЕРИАЛЬНЫЕ ЭНДОТОКСИНЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕКОМБИНАНТНОГО ФАКТОРА С

Испытание на бактериальные эндотоксины с использованием рекомбинантного фактора С (*rFC*) применяют для количественного определения эндотоксинов грамотрицательных бактерий. Испытания с использованием *rFC*, основанные на последовательности гена мечехвоста (*Limulus polyphemus*, *Tachypleus tridentatus*, *Tachypleus gigas* или *Carcinoscorpius rotundicauda*), выполняют с использованием метода флуориметрии.

Испытание осуществляют таким образом, чтобы избежать контаминации бактериальными эндотоксинами.

Рекомендации по применению испытания на бактериальные эндотоксины представлены в общей фармакопейной статье **5.1.10. Применение испытания на бактериальные эндотоксины.**

ОБОРУДОВАНИЕ

Всю стеклянную посуду и другое термостойкое оборудование депирогенизируют методом сухожаровой стерилизации, используя валидированный процесс. Как правило, минимальное время и температура стерилизации составляют 30 мин при 250 °С. Если используют пластиковое оборудование (например, микротитровальные планшеты и наконечники для автоматических пипеток), необходимо подтвердить, что оно не содержит поддающихся обнаружению эндотоксинов и не мешает проведению испытания.

РЕАКТИВЫ

Реактивы

Рекомбинантный фактор С кодируется последовательностью гена мечехвоста (*Limulus polyphemus*, *Tachypleus tridentatus*, *Tachypleus gigas* или *Carcinoscorpius rotundicauda*). Все реактивы, включая флуорогенный субстрат и буферный раствор для анализа, не должны содержать определяемых эндотоксинов.

Растворы реактивов

При необходимости реактивы готовят в соответствии с рекомендациями производителя набора для испытания. Реактивы хранят охлажденными или замороженными в соответствии с рекомендациями производителя.

Вода для испытания на бактериальные эндотоксины

Вода для инъекций *P* или вода, полученная иным способом и не реагирующая с реактивом, использованным на его пределе чувствительности.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ИСХОДНОГО РАСТВОРА СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА ЭНДОТОКСИНА

Исходный раствор стандартного образца эндотоксина готовят из стандартного образца эндотоксина, например, *СО ФЕАЭС эндотоксина*, калиброванного относительно Международного стандартного образца.

Содержание бактериальных эндотоксинов в Международном стандартном образце устанавливается Всемирной организацией здравоохранения и выражается в Международных единицах (МЕ).

1 Международная единица эндотоксина (МЕ) эквивалентна 1 Единице эндотоксина (ЕЭ).

ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА ЭНДОТОКСИНА

Исходный раствор стандартного образца эндотоксина энергично перемешивают и готовят подходящую серию разведений, используя воду для испытания на бактериальные эндотоксины.

Во избежание потери активности из-за адсорбции растворы используют так быстро, как только это возможно.

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ИСПЫТУЕМЫХ РАСТВОРОВ

Готовят испытуемые растворы путем растворения или разведения испытуемого образца активной фармацевтической субстанции или лекарственного препарата с использованием воды для испытания на бактериальные эндотоксины. Для некоторых активных фармацевтических субстанций или лекарственных препаратов может быть более подходящим растворение или разведение в других водных растворах. При необходимости доводят рН испытуемого раствора (или разведения из него) так, чтобы после смешивания реактивов и испытуемого раствора значение рН полученной смеси находилось в диапазоне, указанном производителем набора реактивов, обычно от 6,0 до 8,0. Значение рН доводят до нужного кислотой, основанием или подходящим буферным раствором в зависимости от рекомендаций производителя набора реактивов. Кислота или основание могут быть приготовлены из концентратов или твердых веществ с использованием воды для испытания на бактериальные эндотоксины в контейнерах, не содержащих определяемых эндотоксинов. Буферные растворы должны быть проверены на отсутствие определяемых эндотоксинов и мешающих факторов.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАКСИМАЛЬНО ДОПУСТИМОГО РАЗВЕДЕНИЯ

Максимально допустимое разведение (МДР) представляет собой наибольшее разведение испытуемого образца, при котором может быть определено предельное содержание эндотоксина. Рассчитывают МДР по следующей формуле:

$$\text{МДР} = \frac{\text{предельное содержание эндотоксинов} \cdot \text{концентрация испытуемого раствора}}{\lambda},$$

где:

λ – чувствительность лизата амебоцитов, в МЕ/мл.

Предельное содержание эндотоксинов – предельное содержание эндотоксинов для активных фармацевтических субстанций определяется на основе дозы лекарственного препарата, вводимого парентерально, и рассчитывается по формуле:

$$\text{предельное содержание эндотоксинов} = \frac{K}{M},$$

где:

K – предельная пирогенная доза эндотоксина на килограмм массы тела;

M – максимальная разовая доза лекарственного препарата на килограмм массы тела.

Когда лекарственный препарат вводится с частыми интервалами или инфузионно, M означает общую максимальную дозу, вводимую в течение 1 ч.

Предельное содержание эндотоксинов для активной фармацевтической субстанции, предназначенной для лекарственного препарата, вводимого парентерально, выражают в единицах: МЕ/мл, МЕ/мг, МЕ/Единица биологической активности и др.

Концентрация испытуемого раствора:

– в мг/мл, если предельное содержание эндотоксинов выражено в массовых единицах (МЕ/мг);

– в Ед/мл, если предельное содержание эндотоксинов выражено в пересчете на единицу биологической активности (МЕ/Ед);

– в мл/мл, если предельное содержание эндотоксинов выражено в объемных единицах (МЕ/мл).

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ МЕТОД ФЛУОРИМЕТРИИ

Метод используют для измерения флуоресценции (относительные единицы флуоресценции; ОЕФ), излучаемой флуоресцентным субстратом (реактивом) после его расщепления фактором C , активируемым эндотоксином. В методе используют флуоресцентный тест в конечной точке.

Флуоресцентный тест в конечной точке основан на количественной зависимости для смеси реактивов между концентрацией эндотоксина и флуоресценцией в конце инкубационного периода, выражаемой, например, как $\Delta\text{ОЕФ}$:

$$\Delta\text{ОЕФ} = \text{ОЕФ}_{t_{\text{в конечной точке}}} - \text{ОЕФ}_{t_0},$$

где:

$\text{ОЕФ}_{t_{\text{в конечной точке}}}$ – флуоресценция смеси реактивов в конце инкубационного периода;

ОЕФ_{t_0} – флуоресценция смеси реактивов в начале инкубационного периода.

Испытание выполняют при температуре инкубации, рекомендованной производителем набора реактивов (обычно $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$).

ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ИСПЫТАНИЯ

Для подтверждения правильности флуориметрического метода проводят предварительные испытания. Необходимо убедиться, что выдерживаются требования, предъявляемые к калибровочной кривой (см. раздел *Критерии приемлемости калибровочной кривой стандартного образца эндотоксина* данной общей фармакопейной статьи), и что испытуемый раствор не оказывает влияния на проведение испытания (см. раздел *Мешающие факторы* данной общей фармакопейной статьи).

При внесении в условия испытаний изменений, которые могут повлиять на его результаты, необходимо провести валидацию методики испытания.

КРИТЕРИИ ПРИЕМЛЕМОСТИ КАЛИБРОВОЧНОЙ КРИВОЙ СТАНДАРТНОГО ОБРАЗЦА ЭНДОТОКСИНА

Испытание должно быть выполнено для каждой серии *rFC*.

Чувствительность прибора должна быть настроена в соответствии с рекомендациями производителя набора реактивов для испытания.

Для построения калибровочной кривой используют раствор стандартного образца эндотоксина, из которого готовят не менее трех растворов с концентрациями эндотоксина в диапазоне, указанном производителем набора реактивов. Если требуемый для испытания диапазон превышает $2I_g$ диапазона, указанного производителем, необходимо использовать дополнительные растворы эндотоксина с шагом I_g . Выполняют испытание, используя не менее 3 повторностей растворов каждой концентрации эндотоксина в соответствии с рекомендациями производителя (соотношение объемов, время инкубации, температура, рН и т.д.).

Абсолютное значение коэффициента корреляции $|r|$ для диапазона приготовленных концентраций эндотоксина должно быть больше или равно 0,980.

МЕШАЮЩИЕ ФАКТОРЫ

Поскольку при проведении испытания с рекомбинантным фактором С фактор G не используется, то не ожидается получения ложноположительных результатов из-за активации β -глюканом что необходимо учитывать при сравнении метода с другими методами количественной оценки бактериальных эндотоксинов.

Концентрацию эндотоксинов необходимо выбирать на уровне или около середины калибровочной кривой стандартного образца эндотоксина.

Готовят растворы А, В, С и D, в соответствии с таблицей 2.6.32.-1. Выполняют испытание по крайней мере на двух повторностях этих растворов в соответствии с рекомендациями производителя набора реактивов для испытания (объем испытуемого раствора и смеси реактивов, объемное соотношение испытуемого раствора и смеси реактивов, время инкубации и т.д.).

Таблица 2.6.32.-1

Раствор	Концентрация эндотоксинов	Раствор, к которому прибавляют эндотоксины	Количество повторностей
А	Отсутствует	Испытуемый раствор	Не менее 2
В	Средняя концентрация на калибровочной кривой стандартного образца эндотоксина	Испытуемый раствор	Не менее 2
С	Минимум 3 концентрации (самая низкая концентрация обозначается λ)	Вода для испытания на бактериальные эндотоксины	Каждой концентрации не менее 2
Д	Отсутствует	Вода для испытания на бактериальные эндотоксины	Не менее 2

Раствор А – испытуемый раствор, который может быть разведен, не превышая МДР.
 Раствор В (положительный контроль) – испытуемый раствор в таком же разведении, как и раствор А, содержащий добавленный эндотоксин в концентрации эквивалентной или близкой к середине калибровочной кривой стандартного образца эндотоксина.
 Раствор С – раствор стандартного образца эндотоксина в концентрациях, используемых при валидации метода, как описано в разделе *Критерии приемлемости калибровочной кривой стандартного образца эндотоксина* .
 Раствор Д (отрицательный контроль) – вода для испытания на бактериальные эндотоксины.

Испытание считается проведенным надлежащим образом, если выполняются следующие условия:

- абсолютное значение коэффициента корреляции калибровочной кривой стандартного образца эндотоксина, построенной с использованием раствора С, больше или равно 0,980;

- результат, полученный с раствором Д, не превышает предельного значения контрольного раствора, указанного в описании используемой смеси реактивов, или он меньше, чем предел обнаружения эндотоксина для используемого *rFC*.

Рассчитывают среднее значение открываемости добавленного эндотоксина, вычитая из среднего значения концентрации эндотоксина в растворе В (содержащего добавленный эндотоксин, таблица 2.6.32.-1) среднее значение концентрации эндотоксина в растворе А (если эндотоксин обнаружен, таблица 2.6.32.-1).

Считают, что испытуемый раствор не содержит мешающих факторов, если в условиях испытания измеренная концентрация эндотоксина, добавленного в испытуемый раствор, находится в пределах 50–200% от известной концентрации добавленного эндотоксина после вычитания любого эндотоксина, обнаруженного в растворе без добавления эндотоксина.

Когда значение открываемости эндотоксина выходит за пределы указанного диапазона, считают, что испытуемый раствор содержит мешающие факторы. Повторяют испытание, используя большее разведение, не превышающее МДР. Кроме того, влияние испытуемого раствора или разбавленного испытуемого раствора (не превышающего МДР) можно устранить обработкой с помощью валидированных методов, таких как фильтрация, нейтрализация, диализ, термическая обработка или этапы связывания, специфичные для эндотоксина (обогащение эндотоксина из испытуемого раствора до обнаружения при отсутствии мешающей матрицы). Чтобы установить, что выбранный метод обработки эффективно устраняет мешающее влияние без потери эндотоксинов, повторяют испытание на мешающие факторы с использованием испытуемого препарата, к которому был добавлен стандартный раствор эндотоксина и который затем обработали выбранным методом.

ИСПЫТАНИЕ

МЕТОДИКА

Проводят испытания согласно методике, описанной в разделе *Мешающие факторы* данной общей фармакопейной статьи.

ВЫЧИСЛЕНИЯ И ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Рассчитывают концентрацию эндотоксинов для каждой повторности раствора А, используя калибровочную кривую стандартного образца эндотоксина, полученную на основании раствора С стандартного образца эндотоксина.

Испытание считается проведенным надлежащим образом, если выполняются следующие 3 условия:

(1) результаты, полученные для раствора С, соответствуют требованиям к валидации, указанным в разделе *Критерии приемлемости калибровочной кривой стандартного образца эндотоксина* данной общей фармакопейной статьи;

(2) открываемость эндотоксина, рассчитанная из концентрации эндотоксина, обнаруженной в растворе В, после вычитания концентрации эндотоксина, обнаруженного в растворе А, находится в диапазоне 50–200 %;

(3) результат, полученный с раствором D (отрицательный контроль), не превышает предельного значения контрольного раствора, указанного в описании используемой смеси реактивов, или он меньше, чем предел обнаружения эндотоксина для используемого *rFC*.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ

Испытуемый образец выдерживает испытание, если средняя концентрация эндотоксинов в повторностях раствора А, с учетом разведений и концентраций, ниже, чем предельное значение эндотоксина для испытуемого лекарственного средства.